Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Bader

Untersuchungen zur Kontagiosität von Influenza A 2-Viren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
PETER WARNECKE
aus Quedlinburg

1969

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Bader

Untersuchungen zur Kontagiosität von Influenza A 2-Viren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Peter Warnecke
aus Quedlinburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D e k a n :	Professor Dr. J. Hirschmann
1.Berichterstatter:	Privatdozent Dr. H.J. Gerth (Professor Dr. R.-E. Bader)
2.Berichterstatter:	Professor Dr. H.J. Knüttgen

Inhaltsverzeichnis

A) Einführung in die Fragestellung der vorliegenden Untersuchungen 1

B) Literaturüberblick 2

C) Material

1. Virusstämme 5
2. Mäuse
3. Käfige
4. Erythrozyten
5. Immunseren 8
6. Normalseren 9

D) Methodik

1. Beimpfung der Infektormäuse
2. Kontaktperiode
3. Bestimmung der Zahl der infizierten Infektor- und Acceptormäuse 1o
4. Bestimmung des Infektiositäts-titers von Allantoisflüssig-keiten 12
5. Vergleich der Virulenz ver-schiedener Influenza A2-Stämme 13
6. Elutionsversuche
7. Prüfung der Inhibitoren-empfindlichkeit 14
8. Kreuzhämagglutinations-hemmungsreaktion mit Immunseren 16

E) Versuche und Ergebnisse

1. Vergleichende Untersuchungen der Kontagiosität von ei- bzw. mausadaptierten (P+)- und (P-)-Stämmen 17
2. Verbesserung der Kontagiosität durch hintereinandergeschaltete Übertragungen 18
3. Vergleich der Virulenz von Ausgangs- und AER 1o-Stämmen 24
4. Vergleich der Kontagiosität von Ausgangs- und AER 1o-Stämmen 26
5. Vergleich der Virulenz und Kontagiosität von M^{P+H+}_{--}(A2/Tü/63)AER $2o^{P-H+}_{--}$ und M^{P+H+}_{--}(A2/Tü/63)AER $1o^{P+H+}_{--}$ 3o

6. Vergleich der Virulenz und Kontagiosität von E^{P-H-}(A2/Tü/6o)AER $2o^{P-H+-}$ und M^{P-H-}(A2/Tü/6o) 32

7. Die Entwicklung der Inhibitorenempfindlichkeit im Verlauf der Übertragung 35

8. Das Verhalten von Ausgangs- und AER lo-Stämmen im Kreuzhämagglutinationshemmungstest gegen Immunseren 37

9. Vergleichende Untersuchungen des Elutionsverhaltens von Ausgangs- und AER lo-Stämmen 41

lo. Quantitative Untersuchungen zur Neuraminidaseaktivität bei Ausgangs- und AER 2o-Stämmen 43

F) Diskussion

1. Der Infektionsmodus 44

2. Vergleich der Kontagiosität von ei- bzw. mausadaptierten (P+)- und (P-)-Stämmen 45

3. Die Entwicklung der Kontagiosität im Verlauf der Übertragungen 45

4. Die Entwicklung der Virulenz im Verlauf der Übertragungen 46

5. Die serologische Entwicklung der übertragenen Stämme und ihre Affinität zu Mukoproteinrezeptoren 47

G) Zusammenfassung 49

H) Literaturverzeichnis 51

A) Einführung in die Fragestellung der vorliegenden Untersuchungen

Schulmann und Kilbourne veröffentlichten 1963 und 1967 Arbeiten über "Experimental transmission of influenza virus infektion in mice". Diese Untersuchungen gaben den Anlaß, die in unserem Labor vorhandenen Influenza A2-Stämme in Hinsicht auf ihre Kontagiosität bei Mäusen zu überprüfen, wobei besonders die Frage interessierte, ob zwischen ei- bzw. mausadaptierten pferdeserumempfindlichen und -unempfindlichen Stämmen signifikante Unterschiede nachweisbar wären. Anschließend wurde mittels wiederholter Übertragungen versucht, die Kontagiosität der Stämme zu verbessern. Die übertragenen Stämme wurden im Tierversuch auf Veränderungen der Kontagiosität und Virulenz im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangsstämmen geprüft. Um evtl. vorhandene Relationen zwischen diesen Veränderungen und der Entwicklung der Affinität zu Mukoproteinrezeptoren nachzuweisen, wurden die übertragenen Stämme in bezug auf Inhibitorenempfindlichkeit, Elutionsverhalten, Neuraminidaseaktivität und Verhalten gegen Immunseren im Hämagglutinationshemmungstest mit den Ausgangsstämmen verglichen.

B) Literaturüberblick

Andrewes und Mitarbeiter berichteten 1938, daß bisher nicht infizierte Mäuse (Acceptoren), welche in Kontakt mit an Influenza erkrankten Mäusen (Infektoren) gebracht wurden, eine stammspezifische Immunität erwarben, ohne manifest zu erkranken. 1940 veröffentlichte Eaton Untersuchungen über "Transmission of epidemic influenza virus in mice by contact". Nach Entwicklung eines Modells, welches reproduzierbare Kontaktinfektionen bei Mäusen ermöglichte, untersuchte Eaton den Einfluß verschiedener Faktoren auf die Übertragbarkeit. Die Infektormäuse wurden intranasal mit Influenza-Virus beimpft und nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit den Acceptoren in Kontakt gebracht. Die Anzahl der infizierten Acceptormäuse wurde nach zehn Tagen mit Hilfe der Lungenläsionen beurteilt. Als Zeitraum für eine optimale Virusübertragung wurden 24 bis 48 Stunden nach Beimpfung der Infektormäuse ermittelt. Ferner stellte Eaton fest, daß mit steigender Infektionsdosis des Impfmaterials die Anzahl der infizierten Acceptoren zunahm. Große Acceptormäuse wurden in einem höheren Prozentsatz infiziert als kleine. Der Vergleich der Übertragbarkeit zeigte, daß die hoch mausadaptierten Stämme besser übertragen wurden als die Stämme mit wenigen Mauspassagen. 1963 und 1967 veröffentlichten Schulmann und Kilbourne eine Artikelserie über "Experimental transmission of influenza virus infektion in mice". Unter Abänderung der von Eaton verwendeten Methodik erfolgte die Infektion der Infektormäuse durch virushaltige Aerosole. Nach einer Inkubationszeit von

24 Stunden wurden Infektoren und Acceptoren 24 Stunden in Kontakt gebracht. Anschließend an eine Separationsperiode von 48 Stunden erfolgte die Bestimmung der Zahl der infizierten Acceptoren nach den aufgetretenen Lungenläsionen und durch Verimpfung der Lungenmaterialien auf Bruteier. In dem ersten Artikel der Serie ermittelten Schulmann und Kilbourne (1963 a) in Übereinstimmung mit Eaton eine optimale Kontaktperiode von 24 - 48 Stunden nach Infektion der Infektormäuse. Durch räumliche Trennung von Infektor- und Acceptormäusen wurde nachgewiesen, daß die Infektion der Acceptoren auf aerogenem Wege erfolgte. Der zweite Artikel von Schulmann und Kilbourne (1963 b) zeigte, daß verschiedene Mausstämme unterschiedlich gute Überträger von Influenza-Viren waren und ältere Acceptormäuse häufiger infiziert wurden als junge. Die Übertragbarkeit der Viren war in den Wintermonaten bedeutend größer als im Sommer. Im vierten Artikel der Serie stellte Schulmann (1967) fest, daß zwischen Virulenz und Kontagiosität eines Influenza-Stammes keine Beziehungen bestanden. Der Stamm A2/Jap. 305/57 wurde deutlich besser übertragen als der A/NWS-Stamm, obwohl beide annähernd gleiche Virulenz aufwiesen. Um die Ursache für dieses unterschiedliche Verhalten zu klären, wurden infizierte Mäuse in Kammern untergebracht, welche kontinuierlich mit Luft durchströmt wurden. Durch Auffangen der Luft in Waschflaschen und Verimpfung der Waschflüssigkeit auf Bruteier gelang es bei A2/Jap. 305/57 infektiöses Virus zurückzugewinnen. Entsprechende Versuche mit A/NWS führten zu keinem Erfolg. Aufgrund dieser Versuche entwickelte Schulmann die Hypothese, daß gut übertragbare Stämme

infolge höherer Neuraminidaseaktivität leichter aus den Mucoidsekreten des Respirationstraktes freigesetzt würden bzw. aufgrund ihrer Struktur länger in Tröpfchenform in der Luft überleben könnten.

C) Material

1. Virusstämme

Die in vorliegender Arbeit verwendeten Influenza A2-Stämme wurden während der Untersuchungen von Gerth (1968 a) im Verlauf von Eipassagen in genetisch reine pferde- und hühnerserumempfindliche Stämme (mehrfache Endtitrationen in Bruteiern) und pferde- und hühnerserumunempfindliche Stämme (mehrfache Eititrationen mit 5o % Pferdeserum) gespalten. Einige Stämme wurden nach der Reinigung an erwachsene Mäuse adaptiert und anschließend einer erneuten Reinigung durch Eititrationen mit bzw. ohne Pferdeserum unterzogen.

Die 1. Spalte von Tabelle 2 gibt die genaue Anzahl der Passagen der verwendeten Stämme an. In der 2. Spalte werden die aus Gründen der Übersichtlichkeit in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen dargestellt. Die Bezeichnung "Plus- und Minusstamm" wurde zugunsten folgender Nomenklatur aufgegeben (vergl. D,7):

P+ : Pferdeserumempfindlicher Stamm
P- : Pferdeserumunempfindlicher Stamm
H+ : Hühnerserumempfindlicher Stamm
H- : Hühnerserumunempfindlicher Stamm.

Stämme, die im Verlauf der Untersuchungen aerogen von Infektor- auf Acceptormäuse übertragen wurden, wurden als AER-$N^{P+(\text{bzw. }-),\ H+(\text{bzw. }-)}$ bezeichnet. (N = Anzahl der aerogenen Übertragungen, P = Verhalten gegen Pferdeseruminhibitoren nach N-aerogenen Übertragungen, H = Verhalten gegen Hühnerseruminhibitoren nach N-aerogenen Übertragungen).

Eine aerogene Übertragung entspricht zwei Maus- und einer Bruteipassage (vergl. D 2, D 3b). Außer den in Tabelle 1 aufgeführten genetisch reinen Stämmen wurde ein ungereinigter Influenza A2-Stamm verwendet, der sowohl pferde- und hühnerserumempfindliche als auch pferde- und hühnerserumunempfindliche Viruspartikel enthielt: A2/Tübingen/63 $P^{\pm}$ $H^{\pm}/E_{1o}BM_{1o}E_{1}M_{25}$ (Abk. $M^{P\pm}$ $H^{\pm}$ (A2/Tü/63)).

Tab. 1

Die bei den Untersuchungen verwendeten Influenza-Stämme

	exakte Stammbezeichnung u. Passagenzahl	Abkürzung
ei-adaptierte $(P^+)_i(H^+)$-Stämme	A2/R15/57 $^{P+H+}E_{11}$	E^{P+H+}(A2/R15/57)
	A2/Tübingen/60 $^{P+H+}E_{19}$	E^{P+H+}(A2/Tü/60)
	A2/England 1/61 $^{P+H+}E_{20}$	E^{P+H+}(A2/Engl. 1/61)
	A2/Tübingen/63 $^{P+H+}E_{19}$	E^{P+H+}(A2/Tü/63)
	A2/Ann Arbor 4/63 $^{P+H+}E_{19}$	E^{P+H+}(A2/AA4/63)
	A2/Ann Arbor 1/65 $^{P+H+}E_{14}$	E^{P+H+}(A2/AA1/65)
ei-adaptierte $(P^-)_i(H^-)$-Stämme	A2/R15/57 $^{P-H-}E_{13}$	E^{P-H-}(A2/R15/57)
	A2/Tübingen/60 $^{P-H-}E_{20}$	E^{P-H-}(A2/Tü/60)
	A2/England 1/61 $^{P-H-}E_{20}$	E^{P-H-}(A2/Engl. 1/61)
	A2/Tübingen/63 $^{P-H-}E_{18}$	E^{P-H-}(A2/Tü/63)
maus-adaptierte $(P^+)_i(H^+)$-Stämme	A2/England 1/61 $^{P+H+}E_9BM_{10}M_{10}ET_3$	M^{P+H+}(A2/Engl. 1/61)
	A2/Tübingen/63 $^{P+H+}E_{16}BM_{10}E_1ET_1M_{15}ET_1M_{10}ET_4$	M^{P+H+}(A2/Tü/63)
	A2/Ann Arbor 4/63 $^{P+H+}E_{13}BM_{10}M_{16}ET_2$	M^{P+H+}(A2/AA4/63)
	A2/Ann Arbor 1/65 $^{P+H+}E_9BM_{10}M_2ET_1M_{19}ET_3$	M^{P+H+}(A2/AA1/65)
maus-adaptierte $(P^-)_i(H^-)$-Stämme	A2/Tübingen/60 $^{P-H-}E_{21}M_{13}$	M^{P-H-}(A2/Tü/60)
	A2/England 1/61 $^{P-H-}E_9BM_{10}M_{10}ET_2$	M^{P-H-}(A2/Engl. 1/61)
	A2/Tübingen/63 $^{P-H-}E_9BM_{10}E_1M_{24}ET_3$	M^{P-H-}(A2/Tü/63)

E: Bruteipassage
M: Mauspassage
BM: Babymauspassage
ET: Eititration

2. Mäuse

Als Versuchstiere wurden weiße Mäuse (NMRI-Stamm) mit einem Gewicht von 2o-4o g aus der Zucht des Hygiene-Institutes Tübingen verwendet. In den Versuchen unter Abschnitt E)3. - 6. wurden Mäuse des gleichen Stammes mit einem Gewicht von 35 g benutzt, die von der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere Tübingen bezogen wurden.

3. Käfige

Die bei den Versuchen verwendeten Käfige hatten eine Länge von 2o cm, Breite von 14 cm und Höhe von 12 cm. Bis auf eine Fläche von 48 cm^2, welche sich als notwendig für eine ausreichende Luftzufuhr erwies, wurden die Käfige abgedeckt. Bei den Versuchen, in welchen Acceptor- und Infektormäuse getrennt wurden, wurden Doppelgitter (12 cm mal 14 cm) mit einem Zwischenraum von 1 cm verwendet.

4. Erythrozyten

Für Hämagglutinations- und Hämagglutinationshemmungsreaktionen wurden Erythrozyten verwendet, die durch Punktion der Flügelvene von weißen Leghorn-Hybrid-Hühnern unter Zusatz von 15 % Citrat-Dextrose-Lösung gewonnen wurden. Die Weiterverarbeitung erfolgte nach der Methode von Clarke und Casals (1958). Die für Elutionsversuche verwendeten Human-Erythrozyten der Blutgruppe O wurden von der Blutbank der Chirurgischen Klinik Tübingen bezogen.

5. Immunseren

Weiße Leghorn-Hybrid-Hähnchen wurden mit Allantoisflüssigkeit mit einem Hämagglutinationstiter von 32o beimpft (5 ml. intraperitoneal und 2,5 ml. intravenös)

14 Tage nach der Beimpfung wurde das Blut nach Dekapitation gewonnen.

6. Normalseren

Die Hühnerseren wurden von weißen Leghorn-Hybrid-Hühnern durch Punktion der Flügelvene gewonnen. Pferdeseren stellte uns freundlicherweise Herr Dr. Timm von der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere zur Verfügung.

D) Methodik

1. Beimpfung der Infektormäuse

Die Infektormäuse wurden in leichter Äthernarkose mit vier Tropfen 1 : 10 verdünnter Allantois-flüssigkeit unter Verwendung von Kanülen der No. 1 beimpft.

2. Kontaktperiode

24 Stunden nach der Beimpfung wurden drei Infektormäuse mit vier nicht infizierten Tieren (Acceptoren) in einen Käfig zusammengesetzt. In den Versuchen E 4, 5 und 6 wurde die Zahl der Infektoren auf zehn, die der Acceptoren auf zwanzig erhöht. Zehn von den Acceptormäusen wurden durch ein Doppelgitter von den Infektoren getrennt.

3. Bestimmung der Zahl der infizierten Infektor- und Acceptormäusen

Nach Ablauf der Kontaktperiode wurden Infektoren und Acceptoren mit Chloroform getötet und die Lungen steril entnommen.

a) Die Zahl der infizierten Infektoren wurde nach der aufgetretenen Lungenläsion beurteilt. Die Größe der Lungenläsionen wurde folgendermaßen geschätzt:

0	: Keine Lungenläsion
±	: Keine sichere Lungenläsion (Atelektase?)
+	: Etwa 1/4 der Lunge hämorrhagisch verändert
++	: Etwa 1/2 der Lunge hämorrhagisch verändert
+++	: Etwa 3/4 der Lunge hämorrhagisch verändert
++++	: Lunge fast vollständig hämorrhagisch verändert
+++++	: Maus vor dem vierten Tag nach der Beimpfung gestorben.

b) Die Lungen der Acceptoren wurden steril entnommen und unter Zusatz von 2 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung mit einem ph-Wert von 7,2 zermörsert. Die phosphatgepufferte Kochsalzlösung hatte folgende Zusammensetzung: NaCl 85 g, Na_2HPO_4 mal 12 H_2O 5,65 g, KH_2PO_4 1,35 g, Aqua destillata ad lo l. Um bakterielle Verunreinigungen auszuschalten, wurden die Materialien in der Kühlzentrifuge bei 0° C 6o Minuten mit 22 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung, welche 5oo E Penicillin und 5oo Mikrogramm Streptomycin pro ml enthielt, 1 : lo verdünnt und steril in die Allantoishöhle von lo bis 11 Tage bebrüteten Hühnereiern inokuliert (2 Eier pro Acceptormaus). Die Eier wurden weitere zwei Tage bei 35° C bebrütet. Die Allantoisflüssigkeit wurde steril entnommen und mit dem Hämagglutinationstest auf das Vorhandensein von Virus geprüft. Die Methodik der Hämagglutination entsprach im wesentlichen der vom "Comittee on Standard Serological Procedures in Influenza Studies" (195o) empfohlenen. Die Hämagglutinationsreaktion wurde unter Verwendung von Plexiglasplatten bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ablesung erfolgte nach 45 Minuten. Als eine hämagglutinierende Einheit wurde die Virusmenge definiert, die unter obigen Bedingungen eine vollständige Hämagglutination bewirkte.

c) Die unter a) und b) beschriebene Methodik wurde in den unter E) 4., 5. und 6. dargestellten Versuchen geändert. Die Anzahl der infizierten Acceptoren wurde hier nach der Bildung spezifischer Antikörper gegen das als Impfmaterial verwendete Antigen bestimmt. Acceptor- und Infektormäuse wurden

nach einer dreitägigen Kontaktzeit getrennt. Nach weiteren sieben Tagen wurde den Acceptoren mittels Herzpunktion in Äthernarkose Blut entnommen. Die Lungen wurden auf evtl. vorhandene Läsionen kontrolliert. In den durch Zentrifugieren gewonnenen Seren wurden die neuraminidaseempfindlichen Inhibitoren durch RDE-Behandlung inaktiviert: Zu o,25 ml Serum wurden o,2 ml Penicillin-Streptomycinlösung (5oo IE Penicillin und 5oo Mikrogramm Streptomycin pro ml), o,5 ml 1o % RDE (Behringwerke/Marburg) und 1o,5 ml phosphatgepufferte Kochsalzlösung zugesetzt. Die Lösung wurde 12 bis 16 Stunden im Brutschrank bei 35° C inkubiert. Die Ausschaltung der hitzeempfindlichen Inhibitoren erfolgte durch 3o-Minuten dauerndes Erhitzen bei 56° C. Die Höhe des Antikörperspiegels wurde mit dem Hämagglutinationshemmungstest ermittelt. Die Technik entsprach wieder im wesentlichen der vom "Comittee on Standard Serological Procedures in Influenza Studies" (195o) empfohlenen. Als Hämagglutinationshemmungstiter wurde der reziproke Wert derjenigen Verdünnungsstufe definiert, bei welcher die Hämagglutination durch vier Einheiten Antigen noch zu mindestens 75 % gehemmt wurde.

Der größte Teil der Infektormäuse starb vor dem zehnten Tag nach der Beimpfung. Die Überlebenden wurden am zehnten Tag in Chloroform getötet und ihre Lungen auf das Vorhandensein von Läsionen geprüft.

4. Bestimmung des Infektiositätstiters von Allantoisflüssigkeiten

Die Ermittlung des Infektiositätstiters erfolgte durch Eititrationen. Nach Bestimmung des Hämagglutinations-

titers und Einstellung der Allantoisflüssigkeiten auf gleiche Anzahl von hämagglutinierenden Einheiten wurden Verdünnungsreihen mit dem Faktor 1o hergestellt. Mit jeder Verdünnungsstufe wurden vier Bruteier beimpft. Als Maß für die Infektiosität wurde die ID 5o/o,2 ml verwendet, welche nach der 1931 von Kärber angegebenen Formel berechnet wurde.

5. Vergleich der Virulenz verschiedener Influenza A2-Stämme

Um einen hohen Anteil an infektiösem Virus zu erhalten, wurde für die Bestimmung der Virulenz 24-Stunden-Virus (Allantoisflüssigkeit von Eiern, die nach der Beimpfung nur 24 Stunden bei 35° C bebrütet worden waren) verwendet. Durch Verdünnung mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung wurden die Allantoisflüssigkeiten auf annähernd gleiche Hämagglutinationstiter eingestellt. Der Infektiositätstiter wurde durch Eititrationen ermittelt. Von den zu untersuchenden Allantoisflüssigkeiten wurden Verdünnungsstufen von $1o^{-2}$, $1o^{-3}$ und $1o^{-4}$ hergestellt. Mit jeder Verdünnungsstufe wurden sechs Mäuse infiziert. Die mittlere Überlebenszeit der Mäuse einer Gruppe wurde nach der 1966 von Grunert, Davies, McGahen, Hoffmann und Yates angegebenen Formel ermittelt:

$$MLZ = \frac{\text{Summe } f\,(d - 1)}{N}$$

f = Zahl der Mäuse, die am Tag d nach der Beimpfung starben.

N = Zahl der Mäuse einer Gruppe.

Die mittlere Überlebenszeit der sechs Mäuse einer Verdünnungsstufe wurde unter Berücksichtigung des Infektiositätstiters der Impfmaterialien für den Vergleich der Virulenz verschiedener Stämme verwendet (vergl. E)3., 5., 6.).

6. Elutionsversuche

In sechs Wassermannröhrchen wurde zu je 1 ml Antigen, welches durch Verdünnung mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung von ph 7,2 auf 256 hämagglutinierende Einheiten eingestellt worden war, je 1 ml einer o,5 % Suspension von Humanerythrozyten der Blutgruppe O gegeben. Die Adsorption erfolgte bei 4° C in einem Zeitraum von 3o Minuten. Anschließend wurden die Röhrchen in der Kühlzentrifuge bei 0° C mit 6 bis 8 g zentrifugiert. Auf das Sediment wurden 2 ml phosphatgepufferte Kochsalzlösung von ph 7,2 gegeben. Nach Aufschüttelung wurden die Röhrchen in ein Wasserbad (37 ° C) gestellt. Nach 15, 3o, 45, 6o und 9o Minuten wurde je ein Röhrchen entnommen und lo Minuten mit 6 bis 8 g in der Kühlzentrifuge bei 0° C zentrifugiert (Der Nullwert wurde sofort nach Zugabe der phosphatgepufferten Kochsalzlösung und anschließender Aufschüttelung zentrifugiert). Die Menge des eluierten Hämagglutinins in den Überständen wurde mit dem Hämagglutinationstest ermittelt.

7. Prüfung der Inhibitorenempfindlichkeit

Die Inhibitorenempfindlichkeit der verwendeten Influenza A2-Stämme wurde unter Verwendung von Pferde- und Hühnerseren ermittelt. Da nach Untersuchungen von Gerth (1968 b) keine Parallelität in dem Verhalten eines Influenza A2-Stammes gegenüber Pferde- und Hühnerseruminhibitoren besteht, wurde die Bezeichnung "Plus- und Minusstamm" (Tamm und Choppin, 1961) durch die unter C) 1. angeführte Nomenklatur ersetzt.

Vor der Verwendung wurden die Seren 3o Minuten bei 56° C erwärmt. Nach Tamm und Choppin (1961) steigt dadurch die Aktivität der Inhibitoren, welche in der

Elektrophorese mit Albuminen und Alpha-Globulinen wandern, deutlich an. Bei den mit den Beta-Globulinen wnadernden Inhibitoren ist hingegen nur ein mäßiger Anstieg zu verzeichnen.

Veränderungen der Inhibitorenempfindlichkeit im Verlauf der Übertragungen wurden mit der Hämagglutinationshemmungsreaktion festgestellt. Statt Antiseren wurden hitzevorbehandelte Pferde- bzw. Hühnerseren verwendet. Die quantitative Analyse von (P+)-, (P-)- bzw.(H+)- und (H-)-Partikeln erfolgte durch Vergleich der Hämagglutinationstiter und Hämagglutinationshemmungstiter gegen Pferde- bzw. Hühnerseren. Der Hämagglutinationstiter wurde nach der unter D) 3.b) beschriebenen Technik ermittelt. Bei der Bestimmung des Hämagglutinationshemmungstiters wurden hier gleiche Antigenmengen und -verdünnungen verwendet wie bei der Hämagglutinationsreaktion; jedoch wurde die phosphatgepufferte Kochsalzlösung durch 1 : 5 verdünnte, hitzevorbehandelte Pferde- bzw. Hühnerseren ersetzt:

a) (P-)-Stamm: Der Stamm wird durch Pferdeserum um höchstens eine Titerstufe im Vergleich zur Hämagglutinationsreaktion gehemmt.
b) (P+)-Stamm: Vollständige Hemmung durch Pferdeserum (Titer kleiner als 5) in der Hämagglutinationshemmungsreaktion.
c) (H-)-Stamm: Der Stamm wird durch Hühnerserum um höchstens eine Titerstufe im Vergleich zur Hämagglutinationsreaktion gehemmt.
d) (H+)-Stamm: Vollständige Hemmung durch Hühnerserum (Titer kleiner als 5) in der Hämagglutinationshemmungsreaktion.

8. Kreuzhämagglutinationshemmungsreaktion mit Immunseren

Die Immunseren wurden von weißen Leghorn-Hybrid-Hähnchen gewonnen (vergl. C) 5.). Nach RDE- und Hitzeinaktivierung wurden sämtliche Immunseren mit sämtlichen Antigenen im Hämagglutinationshemmungstest zur Reaktion gebracht.

Die Auswertung erfolgte mittels des 1950 von Archetti und Horsfall angegebenen R-Wertes:

$$R = \sqrt{r_1 \text{ mal } r_2}$$

$$r_1 = \frac{\text{Titer des Antigens } V_1 \text{ mit dem heterologen Serum}}{\text{Titer des Antigens } V_1 \text{ mit dem homologen Serum}}$$

$$r_2 = \frac{\text{Titer des Antigens } V_2 \text{ mit dem heterologen Serum}}{\text{Titer des Antigens } V_2 \text{ mit dem homologen Serum.}}$$

E) Versuche und Ergebnisse

1. Vergleichende Untersuchungen der Kontagiosität von ei- bzw. mausadaptierten (P+)- und (P-)-Stämmen

Für die Untersuchung dieser Fragestellung wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Influenza A2-Stämme verwendet. Die Methodik wurde unter Abschnitt D) 1., 2., 3.a) und 3.b) dargestellt.

Ergebnisse:
In der 1. Zeile von Tabelle 2 wurden die arithmetischen Mittelwerte der Lungenläsionen der Infektormäuse einer Gruppe dargestellt: Die Größe der Lungenläsionen der drei Infektoren wurde addiert (+ = 1, ++ = 2, usw.) und durch die Anzahl der Infektoren dividiert. Erwartungsgemäß verursachten die mausadaptierten Stämme bei den Infektormäusen größere Lungenläsionen als die eiadaptierten. Zwischen (P+)- und (P-)-Stämmen konnten keine deutlichen Differenzen in dieser Hinsicht verzeichnet werden.

Zeile 2 gibt die Anzahl der infizierten Acceptoren an. Die Lungen der Acceptormäuse wiesen keine Läsionen auf. Insgesamt wurden von 64 Acceptoren neun Tiere (= 14 %) infiziert. Bei sechs der verwendeten Influenza A2-Stämme von insgesamt 16 hatte eine Virusübertragung stattgefunden. Bei den (P-)-Stämmen wurden sechs von insgesamt 24 Acceptormäusen infiziert, bei den (P+)-Stämmen hingegen nur drei von 4o. Bei den mausadaptierten Stämmen wurden 4 von 24, bei den eiadaptierten fünf von 4o Acceptormäusen infiziert.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des direkten Testes für kleine Randzahlen nach Fisher (1948).

Tab.2

Vergleichende Untersuchungen der Kontagiosität von ei- bzw. mausadaptierten (P+)- und (P-)-Stämmen

	mausadaptierte Stämme						eiadaptierte Stämme									
	(P+) - Stämme				(P-)-Stämme		(P+) - Stämme						(P-) - Stämme			
	M^{P+H+} A2/Engl. 1/61	M^{P+H+} A2/Tü/ 63	M^{P+H+} A2/AA4/ 63	M^{P+H+} A2/AA1/ 65	M^{P-H-} A2/Engl. 1/61	M^{P-H-} A2/Tü/ 63	E^{P+H+} A2/RI5/ 57	E^{P+H+} A2/Tü/ 60	E^{P+H+} A2/Engl. 1/61	E^{P+H+} A2/Tü/ 63	E^{P+H+} A2/AA4/ 63	E^{P+H+} A2/AA1/ 65	E^{P-H-} A2/RI5/ 57	E^{P-H-} A2/Tü/ 60	E^{P-H-} A2/Engl. 1/61	E^{P-H-} A2/Tü/ 63
arithmetischer Mittelwert der Größe der Lungenläsionen der Infektoren	3	3,8	2,8	2,2	3,8	3,3	2	2	2,3	1,8	2	2,3	1,3	1,8	2	1,8
Zahl der infizierten Acceptoren	1/4	0/4	0/4	0/4	1/4	2/4	0/4	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4	2/4

Für den Vergleich zwischen (P+)- und (P-)-Stämmen ergibt sich ein P-Wert von 2,7 %, d.h. der Unterschied der Kontagiosität muß als signifikant betrachtet werden.

Zwischen ei- und mausadaptierten Stämmen war in bezug auf die Kontagiosität kein Unterschied nachweisbar.

2. Verbesserung der Kontagiosität durch hintereinandergeschaltete Übertragungen

Da die Anzahl der infizierten Acceptoren in den unter E) 1. beschriebenen Versuchen relativ gering war, wurde versucht, die gut übertragbaren Viruspartikel durch Selektion anzureichern. Zu diesem Zweck wurden zehn bzw. zwanzig Virusübertragungen von Infektor- auf Acceptormäuse hintereinandergeschaltet:

——Infektor....Acceptor——Brutei——Infektor....Acceptor——.

Für diesen Versuch wurden folgende Influenza A2-Stämme verwendet:

1. E^{P-H-}(A2/Tü/6o)
2. E^{P+H+}(A2/Tü/6o)
3. M^{P-H-}(A2/Tü/63)
4. M^{P+H+}(A2/Tü/63)

Mit den Stämmen E^{P+H+}(A2/Tü/6o) und M^{P-H-}(A2/Tü/63) wurden zehn, mit den Stämmen E^{P-H-}(A2/Tü/6o) und M^{P+H+}(A2/Tü/63) zwanzig Übertragungen durchgeführt. Die verwendete Methodik wurde unter D) 1., 2., 3.a) und 3.b) dargestellt. Veränderungen der Kontagiosität

wurden nach der Anzahl der infizierten Acceptormäuse beurteilt. Bei den 1o. bis 2o. Übertragungen wurden die Lungen der vier Acceptormäuse einer Gruppe gemeinsam zermörsert und auf zwei Bruteier verimpft. Die Zahl der infizierten Acceptoren wurde in diesen Versuchen nicht mehr ermittelt.

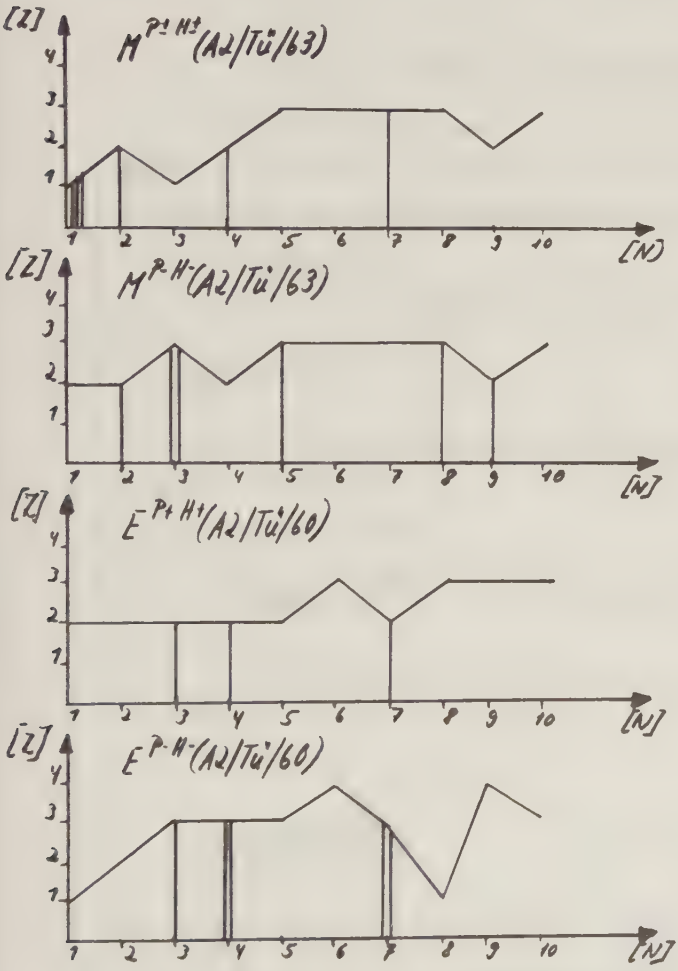
Ergebnisse:

Schaubild 1 zeigt, daß die Entwicklung der Kontagiosität einen gewissen, wenn auch nicht stetigen Anstieg im Verlauf der ersten zehn Übertragungen erkennen läßt. In Tabelle 3 sind die Versuche dargestellt, bei denen keine der vier Acceptormäuse infiziert wurde und welche aus diesem Grunde wiederholt werden mußten. Bei den Wiederholungen wurden die gleichen Impfmaterialien verwendet, die in der Zwischenzeit (eine Woche) bei 4° C im Kühlschrank gelagert worden waren. Die Anzahl der Versuchstiere wurde bei der Wiederholung nicht erhöht. Eine Selektion in Hinsicht auf Größe und Gewicht der Mäuse wurde nicht durchgeführt. Als Ursache für den negativen Ausfall der Versuche müssen verschiedene Faktoren diskutiert werden:

a) Unterschiedliche Größe der Versuchstiere (2o–4o g)
b) Unterschiedliche Temperatur und Luftfeuchtigkeit während der einzelnen Übertragungen
c) Unterschiedlich lange Lagerung der Impfmaterialien. Bei den meisten Übertragungen wurden als Impfmaterialien Allantoisflüssigkeiten verwendet, die nicht länger als eine Woche bei 4° C im Kühlschrank lagerten. Bei den 11. Übertragungen lagerten die Impfmaterialien acht Wochen bei -6o° C; bei den 17., 18. und 19. Übertragungen je drei Wochen bei -6o° C.
d) Verschiedene Infektiositätstiter der Impfmaterialien. Die Hämagglutinationstiter der Impfmaterialien differierten in einem Bereich von 16o - 64o hämagglutinierenden Einheiten, bei den 1. bis 4. Übertragungen der Stämme E^{P-H-}(A2/Tü/6o) und E^{P+H+}(A2/Tü/6o) in einem Bereich von 2o bis 16o.

Schaubild 1

Die Entwicklung der Kontagiosität im Verlauf der Übertragungen



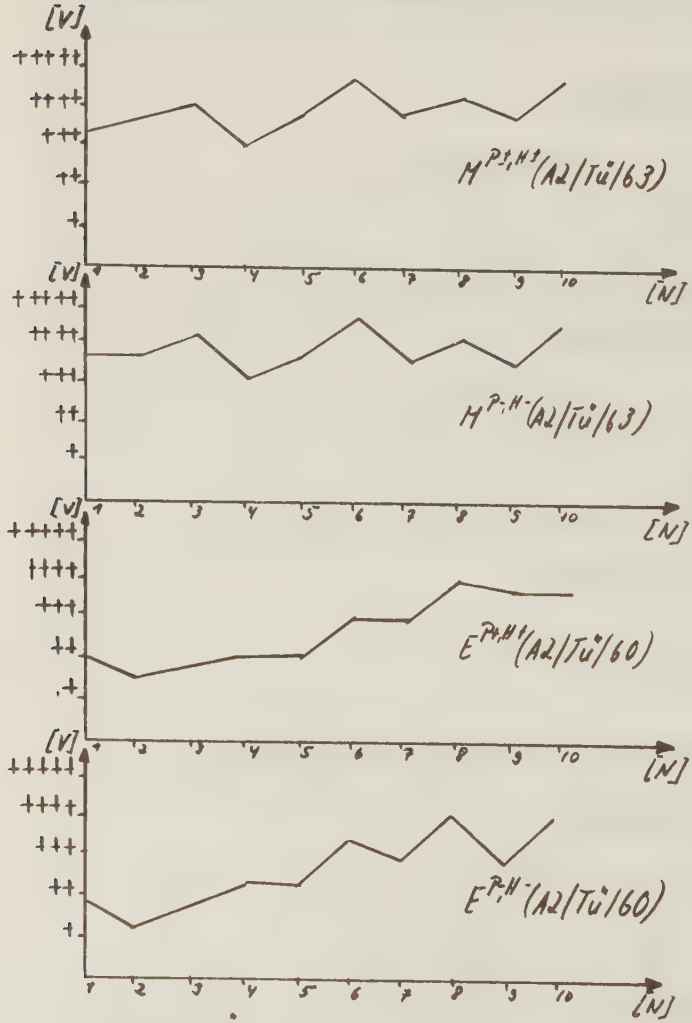
N: Zahl der Übertragungen

Z: Zahl der bei einer Übertragung infizierten Acceptormäuse

| 1mal wiederholt || 2mal wiederholt ||| 3mal wiederholt

Schaubild 2

Die Entwicklung der Virulenz im Verlauf der Übertragungen



N: Zahl der Übertragungen

V: Virulenz, gemessen als arithmetischer Mittelwert der Größe der Lungenläsionen beider Infektormäuse

Tab.3

Die wiederholten Übertragungen

	$M^{P\pm H\pm}$ (A2/Tü/63)	M^{P-H-} (A2/Tü/63)	E^{P+H+} (A2/Tü/60)	E^{P-H-} (A2/Tü/60)
1mal wiederholt	AER2, AER4, AER7, AER17, AER18, AER19.	AER2, AER5 AER8, AER10	AER3, AER4, AER7	AER3, AER17 AER18, AER19
2mal wiederholt		AER3		AER4, AER7, AER11, AER14
3mal wiederholt	AER1, AER11			

Im Schaubild 2 wurde der arithmetische Mittelwert der Größe der Lungenläsionen bei den Infektoren dargestellt. Da die Impfmaterialien nicht auf gleiche Anzahl von infektiösen Viruspartikeln pro Volumeneinheit eingestellt wurden, gestatten diese Werte nur ungenaue Rückschlüsse auf die Entwicklung der Virulenz. Bei den anfangs eiadaptierten Stämmen E^{P-H-}(A2/Tü/6o) und E^{P+H+}(A2/Tü/6o) nahm die Größe der Lungenläsionen im Verlauf der Übertragungen erheblich mehr zu als bei den von vornherein mausadaptierten Stämmen M^{P-H-}(A2/Tü/63) und $M^{P\pm H\pm}$(A2/Tü/63). Für die Entwicklung der Kontagiosität konnten entsprechende Differenzen zwischen ei- und mausadaptierten Stämmen nicht registriert werden. Dieses Ergebnis erlaubt die Schlußfolgerung, daß die relativ große Zunahme der Virulenz bei den anfangs eiadaptierten Stämmen eine Folge der steigenden Mausadaptation bei den Übertragungen war und nicht in Relation zu der Kontagiositätssteigerung gesetzt werden darf.

3. Vergleich der Virulenz von Ausgangs- und AER lo-Stämmen

Um die Virulenzsteigerung im Verlauf der zehn Übertragungen exakt zu ermitteln, wurden die Stämme M^{P-H-}(A2/Tü/63)AER $lo^{P-H\pm}$ und $M^{P\pm H\pm}$(A2/Tü/63)AER $lo^{P\pm H\pm}$ unter Verwendung der unter D) 5. dargestellten Methodik mit den entsprechenden Ausgangsstämmen verglichen.

Ergebnisse:

Die Auswertung der in Tabelle 4 dargestellten Versuchsergebnisse erfolgten durch den Vergleich der mittleren Überlebenszeiten der Versuchstiere der einzelnen Verdünnungsstufen. Das lo^{-4} verdünnte Impfmaterial des Stammes $M^{P\pm H\pm}$(A2/Tü/63)AER $lo^{P\pm H\pm}$ entspricht in bezug

Tab. 4

Vergleich der Virulenz von Ausgangs- und AER 10-Stämmen

		mittlere Überlebenszeiten			
		Ausgangsstämme		AER 10-Stämme	
		$M^{P\pm H\pm}$ A2/Tü/63 $ID_{50/0,2ml} \doteq 10^{6,5}$	M^{P-H-} A2/Tü/63 $ID_{50/0,2ml} \doteq 10^{6,5}$	$M^{P\pm H\pm}$ A2/Tü/63 AER 10 $ID_{50/0,2ml} \doteq 10^{7,5}$	M^{P-H-} A2/Tü/63 AER 10 $ID_{50/0,2ml} \doteq 10^{6,75}$
Verdün-	10^{-2}	6,8	6,7	3,3	5,7
nungs-	10^{-3}	7,3	7,4	5,8	6,5
stufe	10^{-4}	9,2	8,6	6,7	7,0

auf die mittlere Überlebenszeit der lo^{-2} Verdünnung des Ausgangsstammes. Da das Impfmaterial von M^{P+H+}(A2/Tü/63)AER lo^{P+H+} die lo-fache Menge infektiöser Viruspartikel im Vergleich zum Ausgangsstamm enthielt ergibt sich rechnerisch eine Zunahme der Virulenz um den Faktor lo. Bei M^{P-H-}(A2/Tü/63) haben die Mäuse der lo^{-2} Verdünnungsstufe des Ausgangsstammes und die lo^{-3} Verdünnungsstufe des AER lo-Stammes annähernd die gleichen mittleren Überlebenszeiten. Wenn man berücksichtigt, daß der AER lo-Stamm die $lo^{0,25}$-fache Menge infektiöser Partikel enthielt, ergibt sich eine Zunahme der Virulenz um den Faktor $lo^{0,75} = 5,6$. Die große Fehlerbreite der Methode schränkt die Bedeutung der errechneten Faktoren ein und läßt allein die Aussage statthaft erscheinen, daß die Virulenzsteigerung im Vergleich zu der hohen Anzahl von Mauspassagen gering war.

4. Vergleich der Kontagiosität von Ausgangs- und AER lo-Stämmen

Um nachzuweisen, daß im Verlauf der Übertragungen eine Kontagiositätsverbesserung auftrat, die unabhängig von der Zunahme der Virulenz war, wurden die AER lo-Stämme unter Verwendung der Ergebnisse des Versuches E) 3. auf gleiche Virulenz zu den entsprechenden Ausgangsstämmen eingestellt. Zu diesem Zweck wurden als Impfmaterialien für M^{P-H-}(A2/Tü/63)AER $lo^{P-H\pm}$ die Verdünnungsstufe lo^{-3} und für M^{P+H+}(A2/Tü/63)AER lo^{P+H+} die Verdünnungsstufe lo^{-4} verwendet, welche in bezug auf die mittlere Überlebenszeit den lo^{-2} Verdünnungen der Ausgangsstämme entsprachen (vergl. Tabelle 4).

Bei den eiadaptierten Stämmen E^{P-H-}(A2/Tü/6o) und E^{P+H+}(A2/Tü/6o) wäre eine Einstellung auf gleiche Virulenz mit den entsprechenden AER lo-Stämmen nicht sinnvoll gewesen. Die eiadaptierten Ausgangsstämme hätten konzentriert, die inzwischen mausadaptierten AER lo-Stämme sehr hoch verdünnt verimpft werden müssen, um gleich große Lungenläsionen zu erzielen. Eine konzentrierte Verimpfung hätte es jedoch unmöglich gemacht zu entscheiden, ob die Lungenläsionen Folge der Vermehrung oder der toxischen Wirkung der Viren gewesen wären. Andererseits hätte eine zu hohe Verdünnung der Impfmaterialien der AER lo-Stämme keine genügend große Kontagiosität gewährleistet. Aus diesen Gründen wurden die als Impfmaterialien verwendeten Allantoisflüssigkeiten (24-Stunden-Virus) von Ausgangs- und AER lo-Stämmen nur auf eine gleiche Anzahl von hämagglutinierenden Einheiten (16o) eingestellt.

Um die Zunahme der Kontagiosität statistisch signifikant nachzuweisen, wurde die Zahl der Infektoren auf lo, die der Acceptoren auf 2o pro Versuch erhöht. Die Hälfte der Acceptormäuse wurde durch ein Doppelgitter von den Infektoren getrennt. Das Gewicht der Mäuse betrug in diesem Versuch 35 g. Um den Einfluß von Temperatur und Luftfeuchtigkeit auszuschalten, wurden die Vergleiche von Ausgangs- und AER lo-Stämmen im gleichen Raum und zur gleichen Zeit durchgeführt. Die Anzahl der infizierten Acceptoren wurde nach der unter D) 3.c) dargestellten Methodik ermittelt.

Tab. 5

Vergleich der Kontagiosität von Ausgangs und AER 10 - Stämmen

		Ausgangsstämme				AER 10 - Stämme			
		M^{P+H+} A2/Tü/63	M^{P-H-} A2/Tü/63	E^{P+H+} A2/Tü/60	E^{P-H-} A2/Tü/60	M^{P+H+} A2/Tü/63 $AER10^{P+H+}$	M^{P-H-} A2/Tü/63 $AER10^{P-H-}$	E^{P+H+} A2/Tü/60 $AER10^{P-H+}$	E^{P-H-} A2/Tü/60 $AER10^{P-H-}$
Zahl der infizierten Acceptoren	ohne Gitter	2/10	3/10	1/10	3/10	5/10	7/10	3/10	7/10
	mit Gitter	0/10	1/10	0/10	0/10	2/10	3/10	2/10	4/10

Ergebnisse:
Der Vergleich der infizierten Acceptoren bei Ausgangs- und AER lo-Stämmen in Tabelle 5 zeigt, daß die Kontagiosität im Verlauf der Übertragungen deutlich zunahm. Um diese Differenz statistisch zu sichern, wurde eine Auswertung unter Verwendung des direkten Testes für kleine Randzahlen nach Fisher durchgeführt. Um eine genügend große Anzahl von Meßwerten zu haben, wurden die Ergebnisse von M^{P-H-}(A2/Tü/63) und M^{P+H+}(A2/Tü/63) zusammen verwertet. Beide AER lo-Stämme waren auf gleiche Virulenz zu ihren entsprechenden Ausgangsstämmen eingestellt worden (siehe oben). Damit ergibt sich eine Zahl von 17 infizierten Acceptoren von insgesamt 4o bei den AER lo-Stämmen und 6 infizierten Acceptoren von 4o bei den Ausgangsstämmen. Der Test nach Fisher liefert für diese Differenz einen P-Wert von o,62 %; d.h. die AER lo-Stämme wurden statistisch signifikant besser übertragen als die Ausgangsstämme. Da die AER lo-Stämme auf gleiche Virulenz zu den entsprechenden Ausgangsstämmen eingestellt worden waren, darf die Steigerung der Kontagiosität nicht auf eine Virulenzzunahme zurückgeführt werden.

Aus oben angeführten Gründen wurden die Impfmaterialien der Stämme E^{P-H-}(A2/Tü/6o) und E^{P+H+}(A2/Tü/6o) nur auf gleiche Hämagglutinationstiter mit den Ausgangsstämmen eingestellt. Wie Tabelle 5 zeigt, waren die mittleren Überlebenszeiten der Infektormäuse der AER lo-Stämme erheblich niedriger als die Überlebenszeiten der Infektoren der Ausgangsstämme. Die Ursache liegt wohl zum Teil in einer Virulenzsteigerung durch Mausadaptation im Verlauf der Übertragungen; andererseits kann aber nicht ausgeschlossen

werden, daß die Impfmaterialien der AER 1o-Stämme eine größere Anzahl von infektiösen Partikeln enthielten. Die Signifikanz der Kontagiositätssteigerung wurde wieder mit dem Fisher-Test geprüft. Unter Zusammenfassung der Ergebnisse der Stämme E^{P-H-}(A2/Tü/6o) und E^{P+H+}(A2/Tü/6o) ergibt sich bei den AER 1o-Stämmen eine Zahl von 16 infizierten Acceptoren von insgesamt 4o und bei den Ausgangsstämmen eine Zahl von 4 infizierten Acceptoren von 4o. Der Fisher-Test liefert für diese Differenz einen P-Wert von o,1 %. Die Kontagiosität der AER 1o-Stämme war also auch hier signifikant höher als die der Ausgangsstämme.

5. Vergleich der Virulenz und Kontagiosität von M^{P+H+}(A2/Tü/63)AER $2o^{P-H+}$ und M^{P+H+}(A2/Tü/63)AER $1o^{P+H+}$

Mit Hilfe einer Eititration wurde Allantoisflüssigkeit von M^{P+H+}(A2/Tü/63)AER $2o^{P-H+}$ auf $1o^{7,5}$ ID 5o/o,2 ml eingestellt, d.h. auf die gleiche Anzahl von infektiösen Viruspartikeln pro Volumeneinheit, die der Stamm M^{P+H+}(A2/Tü/63)AER $1o^{P+H+}$ im Versuch E) 3. enthielt. Mit dem eingestellten Impfmaterial (Allantoisflüssigkeit, 24-Stunden-Virus) wurden Verdünnungsstufen von $1o^{-2}$, $1o^{-3}$, $1o^{-4}$ und $1o^{-5}$ hergestellt. Mit jeder Verdünnungsstufe wurden sechs Mäuse mit einem Gewicht von je 35 g beimpft. Die mittlere Überlebenszeit der Versuchstiere wurde in Tabelle 6 zusammengestellt. Mit der Verdünnungsstufe $1o^{-5}$ (mittlere Überlebenszeit = 7,1), die in der Virulenz annähernd der $1o^{-4}$ Verdünnungsstufe von M^{P+H+}(A2/Tü/63)AER $1o^{P+H+}$ entsprach (mittlere Überlebenszeit = 6,7), wurden zehn Infektormäuse infiziert. Die Infektoren wurden wieder mit 2o Acceptormäusen, von denen zehn durch ein

Tab. 6

Ermittlung der Virulenz von $M^{P\pm H\pm}(A2/Tü/63)AER20^{P-H\pm}$

		mittlere Überlebenszeit
Verdünnungsstufe	10^{-2}	2,7
	10^{-3}	4,6
	10^{-4}	6,1
	10^{-5}	7,1

Tab. 7

Ermittlung der Kontagiosität von $M^{P\pm H\pm}(A2/Tü/63)AER20^{P-H\pm}$

	Zahl der infizierten Acceptoren
ohne Gitter	5/10
mit Gitter	1/10

Doppelgitter abgetrennt worden waren, in Kontakt gebracht. Das weitere Vorgehen entsprach der unter D) 3. c) dargestellten Methodik.

Ergebnisse:

Der Vergleich der mittleren Überlebenszeiten der einzelnen Verdünnungsstufen der Stämme $M^{P\pm H\pm}$(A2/Tü/63)AER $2o^{P-H\pm}$ (vergl. Tabelle 6) und $M^{P+H\pm}$(A2/Tü/63)AER $1o^{P+H\pm}$ (vergl. Tabelle 4) zeigt, daß die Virulenz um weniger als den Faktor 1o zunahm. Im Vergleich zu der relativ großen Anzahl von Mauspassagen (2o Maus- und 1o Bruteipassagen) muß diese Virulenzsteigerung als relativ gering bezeichnet werden. Die Kontagiosität stieg im Verlauf der letzten zehn Übertragungen nicht weiter an. Bei dem AER 2o-Stamm wurden sechs von 2o Acceptormäusen infiziert, von dem AER 1o-Stamm hingegen sieben von 2o Acceptoren. Da diese Differenz nicht signifikant ist, kann sie auf die Fehlerbreite der Methode zurückgeführt werden.

6. Vergleich der Virulenz und Kontagiosität von E^{P-H-}(A2/Tü/6o)AER $2o^{P-H\pm}$ und M^{P-H-}(A2/Tü/6o)

Um die Aussagen über die Entwicklung der Virulenz zu erweitern wurde der aerogen übertragene Stamm E^{P-H-}(A2/Tü/6o)AER $2o^{P-H\pm}$ mit einem mausadaptierten Stamm M^{P-H-}(A2/Tü/6o) (siehe Tabelle 1) verglichen. Bei letzterem Stamm erfolgte die Mausadaption durch direkte Überimpfung der Lungenmaterialien von Maus zu Maus ohne dazwischen geschaltete Bruteipassagen. Allantoisflüssigkeiten (24-Stunden-Virus) beider Stämme wurden mittels

Eititrationen auf $10^{6,5}$ ID 50/0,2 ml eingestellt. Der Vergleich der Virulenz wurde nach der unter D) 5. dargestellten Methodik durchgeführt. Für die Ermittlung der Kontagiosität wurden Verdünnungsstufen mit annähernd gleicher Virulenz verwendet (vergl. Tabelle 8):

E^{P-H-}(A2/Tü/60)AER $20^{P-H\pm}$: 10^{-2}
M^{P-H-}(A2/Tü/60) : 10^{-3}

Die angewendete Methodik wurde unter D) 1., 2. und 3. c) dargestellt.

Ergebnisse:

Die in Tabelle 8 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Verdünnungsstufe 10^{-3} von M^{P-H-}(A2/Tü/60) der 10^{-2} Verdünnung von E^{P-H-}(A2/Tü/60)AER $20^{P-H\pm}$ entspricht. Der Stamm M^{P-H-}(A2/Tü/60), welcher 13 Mauspassagen ohne dazwischengeschaltete Bruteipassagen aufwies, war also virulenter als der 20 mal aerogen übertragene Stamm E^{P-H-}(A2/Tü/60)AER $20^{P-H\pm}$ (40 Mauspassagen und 20 Bruteipassagen). Von dem Stamm E^{P-H-}(A2/Tü/60)AER $20^{P-H\pm}$ wurden acht von insgesamt 20 Acceptormäusen infiziert. Bei M^{P-H-}(A2/Tü/60) trat hingegen eine Infektion der Acceptoren nicht ein. Dieser Versuch bestätigt also, daß zwischen der Virulenz und der Kontagiosität eines Influenza A2-Stammes keine direkten Beziehungen bestehen.

Tab. 8

Vergleich der Virulenz von E^{P-N-}(A2/Tü/60)AER20$^{P-N\pm}$ und M^{P-N-}(A2/Tü/60)

		mittlere Überlebenszeit	
		E^{P-N-} (A2/Tü/60) AER20$^{P-N\pm}$	M^{P-N-} (A2/Tü/60)
Verdünnungsstufe	10^{-2}	4,3	3,2
	10^{-3}	6,2	4
	10^{-4}	6,7	5,8

Tab. 9

Vergleich der Kontagiosität von E^{P-N-}(A2/Tü/60)AER20$^{P-N\pm}$ und M^{P-N-}(A2/Tü/60)

		E^{P-N-} (A2/Tü/60) AER20$^{P-N\pm}$	M^{P-N-} (A2/Tü/60)
Zahl der infizierten Acceptormäuse	ohne Gitter	7/10	0/10
	mit Gitter	1/10	0/10

7. Die Entwicklung der Inhibitorenempfindlichkeit im Verlauf der Übertragungen

Die Untersuchung der Stämme auf ihre Inhibitorenempfindlichkeit wurde mit Hühner- bzw. Pferdeserum durchgeführt. Die angewendete Methodik wurde unter D) 7. dargestellt.

Ergebnisse:

Tabelle 1o und die erste Zeile von Tabelle 11 zeigen, daß die Ausgangsstämme im bezug auf ihre Inhibitorenempfindlichkeit folgendes Verhalten aufwiesen:

E^{P-H-}(A2/Tü/6o) :P-H-
$E^{P\pm H+}$(A2/Tü/6o) : P+H+
M^{P-H-}(A2/Tü/63) : P-H-
$M^{P+H\pm}$(A2/Tü/63) : $P\pm H\pm$

Die in Zeile 2 und 3 von Tabelle 11 dargestellten AER 1o- bzw. AER 2o-Stämme zeigten folgende Änderungen der Inhibitorenempfindlichkeit:

E^{P-H-}(A2/Tü/6o)AER $1o^{P-H\pm}$: $P-H\pm$
E^{P+H+}(A2/Tü/6o)AER $1o^{P-H\pm}$: $P-H\pm$
M^{P-H-}(A2/Tü/63)AER $1o^{P-H\pm}$: $P-H\pm$
$M^{P+H\pm}$(A2/Tü/63)AER $1o^{P\pm H\pm}$: $P\pm H\pm$

E^{P-H-}(A2/Tü/6o)AER $2o^{P-H\pm}$: $P-H\pm$
$M^{P+H\pm}$(A2/Tü/63)AER $2o^{P-H\pm}$: $P-H\pm$

Bei den pferdeserumunempfindlichen Stämmen E^{P-H-}(A2/Tü/6o) und M^{P-H-}(A2/Tü/63) traten im Verlauf der Übertragungen keine Veränderungen der Empfindlichkeit gegenüber Pferdeserum auf. Andererseits

Die Entwicklung der Inhibitorenempfindlichkeit im Verlauf der Übertragungen

Tab. 10

Hämagglutinationstiter der Ausgangsstämme mit Kochsalz-Phosphatpuffer bzw. mit Pferdeserum

	Pferdeserum	Kochsalz-Phosphatpuffer
E^{P-H-}(A2/Tü/60)	160	320
E^{P+H+}(A2/Tü/60)	< 5	40
M^{P-H-}(A2/Tü/63)	20	40
M^{P+H+}(A2/Tü/63	40	320

Tab. 11

Hämagglutinationshemmungstiter von Ausgangs- und übertragenen Stämmen gegen Pferde- und Hühnerseren

	Pferdeserum	Hühnerserum
E^{P-H-}(A2/Tü/60)	< 5	< 5
E^{P+H+}(A2/Tü/60)	3840	1280
M^{P-H-}(A2/Tü/63)	< 5	< 5
M^{P+H+}(A2/Tü/63)	320	160
E^{P-H-}(A2/Tü/60)AER10 $^{P-H+}$	< 5	80
E^{P+H+}(A2/Tü/60)AER10 $^{P-H+}$	< 5	80
M^{P-H-}(A2/Tü/63)AER10 $^{P-H+}$	< 5	80
M^{P+H+}(A2/Tü/63)AER10 $^{P+H+}$	20	40
E^{P-H-}(A2/Tü/60)AER20 $^{P-H+}$	< 5	40
M^{P+H+}(A2/Tü/63)AER20 $^{P-H+}$	< 5	40

entwickelte sich der pferdeserumempfindliche Stamm E^{P+H+}(A2/Tü/6o) zu einem (P-)-Stamm. Die Pferdeserumempfindlichkeit von M^{P+H+}(A2/Tü/63) nahm bis zur lo. Übertragung ab und hatte sich bei der 2o. vollständig verloren. Der Vergleich der Inhibitorenempfindlichkeit gegenüber Hühnerserum zeigt, daß sich die AER lo- bzw. AER 2o-Stämme auf einen annähernd gleichen Titer von 4o - 8o einstellten. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sich die Stämme im Verlauf der Übertragungen im bezug auf ihre Inhibitorenempfindlichkeit weitgehend annäherten und eine Selektion von pferdeserumunempfindlichen Viruspartikeln stattfand.

8. Das Verhalten von Ausgangs- und AER lo-Stämmen im Kreuzhämagglutinationshemmungstest gegen Immunseren

In Tabelle 12 a sind die Hämagglutinationshemmungstiter sämtlicher Antigene gegen sämtliche Antiseren dargestellt. Die verwendete Methodik wurde unter D) 8. beschrieben. Der rechte untere Quadrant der Tabelle enthält die Hemmungstiter der Ausgangsstämme gegen die Antiseren der Ausgangsstämme. Die höchsten Titer auch gegen heterologe Antiseren zeigt der mausadaptierte (P±)-Stamm M^{P+H+}(A2/Tü/63), die zweithöchste der mausadaptierte (P-)-Stamm M^{P-H-}(A2/Tü/63), die dritthöchste der eiadaptierte (P+)-Stamm E^{P+H+}(A2/Tü/6o); die niedrigsten Titer weist der eiadaptierte (P-)-Stamm E^{P-H-}(A2/Tü/6o) auf. Die Abnahme der Hemmungstiter in dieser Reihenfolge zeigt, daß die mausadaptierten Stämme eine größere Avidität aufwiesen als die eiadaptierten und (P+)-Partikel avider waren als (P-)-Partikel. Im Verlauf der Übertragungen trat eine Bevorzugung der (P-)-Partikel auf, andererseits wurden sie höher bzw. neu mausadaptiert, so daß sich die Avidität unterschiedlich entwickelte:

Ermittlung der Antigenverwandtschaft und Antikörperempfindlichkeit bei Ausgangs- und AER10-Stämmen

Tab. 12a

Antigen \ Antiserum	Hämagglutinationshemmungstiter							
	$M^{P\pm H\pm}$ (A2/Tü/63) $AER10^{P\pm H\pm}$	M^{P-H-} (A2/Tü/63) $AER10^{P-H\pm}$	E^{P-H-} (A2/Tü/60) $AER10^{P-H\pm}$	E^{P+H+} (A2/Tü/60) $AER10^{P-H\pm}$	$M^{P\pm H\pm}$ (A2/Tü/63)	M^{P-H-} (A2/Tü/63)	E^{P-H-} (A2/Tü/60)	E^{P+H+} (A2/Tü/60)
$M^{P\pm H\pm}$(A2/Tü/63)$AER10^{P\pm H\pm}$	512	1024	512	2048	32	128	256	32
M^{P-H-}(A2/Tü/63)$AER10^{P-H\pm}$	256	1024	512	2048	64	256	128	64
E^{P-H-}(A2/Tü/60)$AER10^{P-H\pm}$	128	128	256	1024	8	32	128	32
E^{P+H+}(A2/Tü/60)$AER10^{P-H\pm}$	64	256	256	1024	8	16	32	32
$M^{P\pm H\pm}$(A2/Tü/63)	1024	512	1024	4096	128	512	512	128
M^{P-H-}(A2/Tü/63)	128	128	128	1024	32	64	128	32
E^{P-H-}(A2/Tü/60)	16	32	32	512	< 4	< 4	32	16
E^{P+H+}(A2/Tü/60)	256	256	512	512	16	16	32	32

Tab. 12b

Antigen \ Antiserum	R-Werte							
	$M^{P\pm H\pm}$ (A2/Tü/63) AER 10 $^{P\pm H\pm}$	M^{P-H-} (A2/Tü/63) AER 10 $^{P-H\pm}$	E^{P-H-} (A2/Tü/60) AER 10 $^{P-H\pm}$	E^{P+H+} (A2/Tü/60) AER 10 $^{P-H\pm}$	$M^{P\pm H\pm}$ (A2/Tü/63)	M^{P-H-} (A2/Tü/63)	E^{P-H-} (A2/Tü/60)	E^{P+H+} (A2/Tü/60)
$M^{P\pm H\pm}$ (A2/Tü/63) AER 10 $^{P\pm H\pm}$	1	0,7	0,7	0,5	0,7	0,7	0,5	0,7
M^{P-H-} (A2/Tü/63) AER 10 $^{P-H\pm}$		1	0,5	0,7	0,5	0,7	0,35	0,7
E^{P-H-} (A2/Tü/60) AER 10 $^{P-H\pm}$			1	1	0,5	0,5	0,7	1,4
E^{P+H+} (A2/Tü/60) AER 10 $^{P-H\pm}$				1	0,5	0,5	0,7	0,7
$M^{P\pm H\pm}$ (A2/Tü/63)					1	1,1	0,7	0,7
M^{P-H-} (A2/Tü/63)						1	0,5	0,5
E^{P-H-} (A2/Tü/60)							1	0,7
E^{P+H+} (A2/Tü/60)								1

Der nur noch gering pferdeserumempfindliche Stamm M^{P+H+}_{-}(A2/Tü/63)AER lo^{P+H+}_{-} besitzt eine geringere Avidität als der mausadaptierte, relativ stark pferdeserumempfindliche Ausgangsstamm.

Der (P-)-Stamm M^{P-H-}(A2/Tü/63)AER lo^{P-H+}_{-} ist hingegen avider als der entsprechende mausadaptierte, pferdeserumunempfindliche Ausgangsstamm.

Der durch die Übertragungen mausadaptierte Stamm E^{P-H-}(A2/Tü/6o)AER lo^{P-H+}_{-} nahm ebenfalls an Avidität gegenüber dem eiadaptierten, pferdeserumunempfindlichen Ausgangsstamm zu.

Hingegen ist bei dem Stamm E^{P+H+}(A2/Tü/6o)AER lo^{P-H+}_{-} keine eindeutige Veränderung der Avidität zu verzeichnen. Die Ursache muß in einer Überlagerung von Mausadaptation und der Entwicklung zu einem (P-)-Stamm gesucht werden.

Die starke Veränderung der Avidität erschwert es, eine Aussage über die Entwicklung der Antigenität zu machen. Der Vergleich der R-Werte in Tabelle 12 b zeigt, daß sich die Stämme E^{P-H-}(A2/Tü/6o)AER lo^{P-H+}_{-} und E^{P+H+}(A2/Tü/6o)AER lo^{P-H+}_{-} vollständig anglichen. Unter den Stämmen M^{P+H+}_{-}(A2/Tü/63)AER lo^{P+H+}_{-} und M^{P-H-}(A2/Tü/63)AER lo^{P-H+}_{-} blieben nicht signifikante Differenzen der R-Werte bestehen. Eine Annäherung der Stämme (A2/Tü/63)AER lo und (A2/Tü/6o)AER lo im Vergleich zu der Verwandtschaft der entsprechenden Ausgangsstämme konnte nicht verzeichnet werden.

9. Vergleichende Untersuchungen des Elutionsverhaltens von Ausgangs- und AER lo-Stämmen

Die Elutionsversuche wurden nach der unter D) 6. dargestellten Methodik durchgeführt. Im Schaubild 3 ist die Menge des eluierten Hämagglutinins in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die pro Zeiteinheit eluierte Virusmenge ist in Prozent angegeben (loo % entsprechen einem Hämagglutinationstiter von 128). Die Ausgangsstämme zeigen unter Berücksichtigung der Ei- bzw. Mausadaptation ein typisches Elutionsverhalten.
Bei den AER lo-Stämmen wurden in einer Zeit von 9o Minuten 25 - 5o % aller Viruspartikel eluiert. Die Steigung der Kurven, welche der Elutionsgeschwindigkeit entspricht, ist im Vergleich zu den Ausgangsstämmen relativ gleichmäßig.
Die Elutionsgeschwindigkeit nahm im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangsstämmen bei

M^{P+H+}(A2/Tü/63)AER lo^{P+H+} und
E^{P-H-}(A2/Tü/6o)AER lo^{P-H+} ab, während sie bei
M^{P-H-}(A2/Tü/63)AER lo^{P-H+} und
E^{P+H+}(A2/Tü/6o)AER lo^{P-H+} zunahm.

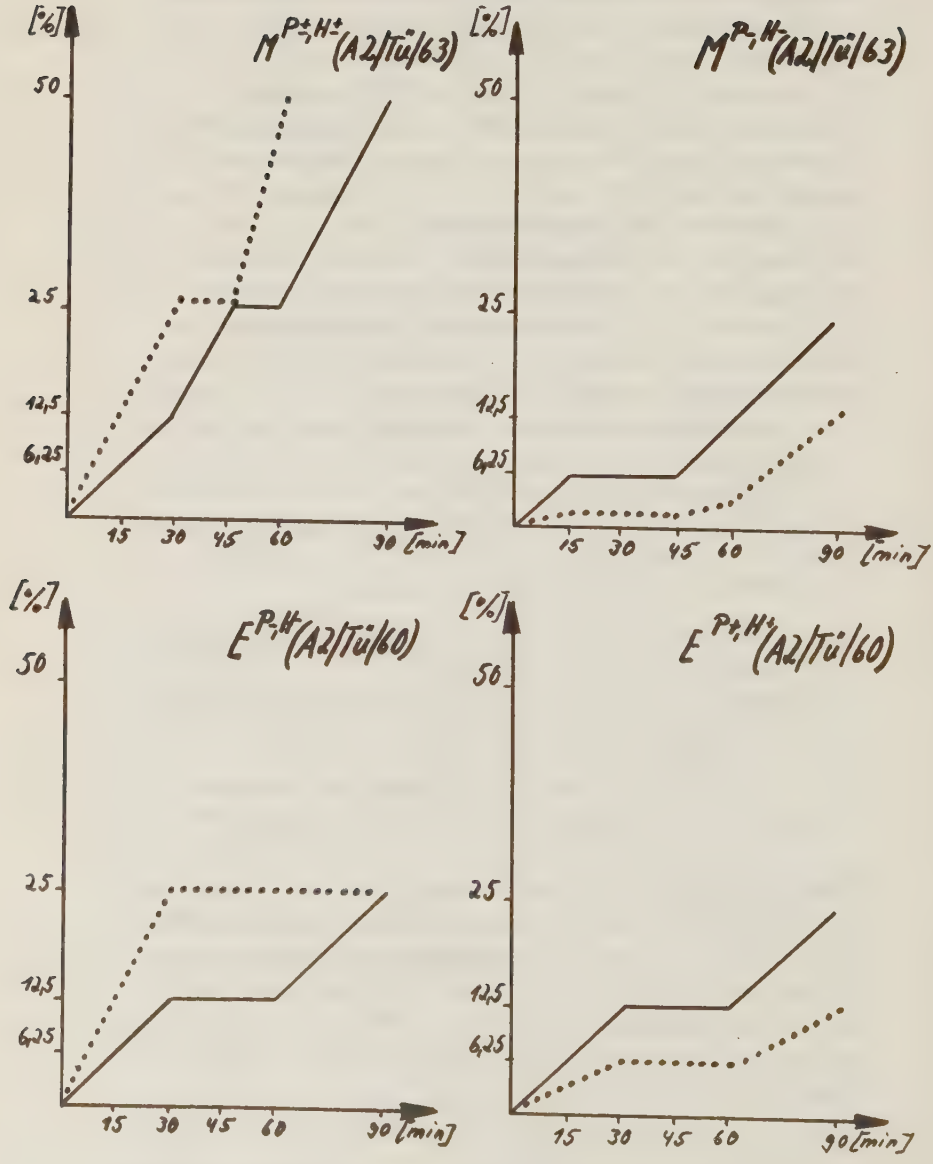
Die in 9o Minuten eluierte Virusmenge entsprach bei
M^{P+H+}(A2/Tü/63)AER lo^{P+H+} und
E^{P-H-}(A2/Tü/6o)AER lo^{P-H+} der der Ausgangsstämme.

Bei M^{P-H-}(A2/Tü/63)AER lo^{P-H-} und
E^{P+H+}(A2/Tü/6o)AER lo^{P-H+} wurde 12,5 % mehr Hämagglutinin eluiert als von den Ausgangsstämmen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sich die AER lo-Stämme untereinander in ihrem Elutionsverhalten annäherten. Da die Elutionsgeschwindigkeit der AER lo-Stämme im Vergleich zu den Ausgangsstämmen teils zu teils abnahmen, besteht kein Anhalt dafür, daß die Kontagiositätszunahme durch in der Elution erfaßbare Faktoren bedingt ist.

Schaubild 3

Elutionsversuche



1o. Quantitative Untersuchungen zur Neuraminidase-aktivität bei Ausgangs- und AER 2o-Stämmen

Die Bestimmung der Neuraminidaseaktivität erfolgte nach der 1961 von Aminoff angegebenen Methode. Als Substrat wurde Sialolaktose verwendet. Diese Versuche wurden freundlicherweise von Frl. Kienzle vom Viruslabor des Hygiene-Institutes Tübingen durchgeführt.

Ergebnisse:

M^{P+H+}(A2/Tü/63) : 7,1 Mikrogramm Acetylneuraminsäure / ml

M^{P+H+}(A2/Tü/63)AER $2o^{P-H+}$: 7,5 Mikrogramm Acetylneuraminsäure / ml

E^{P-H-}(A2/Tü/6o) : 9,1 Mikrogramm Acetylneuraminsäure / ml

E^{P-H-}(A2/Tü/6o)AER $2o^{P-H+}$: 7,6 Mikrogramm Acetylneuraminsäure / ml

Der Vergleich der Ergebnisse läßt erkennen, daß die Neuraminidaseaktivität gemessen am kleinmolekularen Substrat im Verlauf der Übertragungen nicht zunahm. Die Hypothese von Schulmann (1967), welcher die Kontagiosität in Beziehung zu einer hohen Neuraminidaseaktivität setzte, konnte also nicht bestätigt werden.

F) Diskussion

1. Der Infektionsmodus

Die Ergebnisse der Versuche E) 4., 5. und 6., in welchen ein Teil der Acceptormäuse durch Doppelgitter von den Infektoren getrennt wurde, beweisen, daß die Übertragung auf aerogenem Wege erfolgte. Als Infektionsmodus muß sowohl Tröpfcheninfektion als auch Staubinfektion in Betracht gezogen werden. Da die Freisetzung von Tröpfchen vermutlich nur durch den Vorbeistrom von Expirationsluft am Respirationsepithel erfolgte ist anzunehmen, daß Tröpfcheninfektion nur auf kürzeste Entfernungen erfolgte. Die Möglichkeit der Staubinfektion wird durch Untersuchungen von Loosli, Lemon, Robertson und Appel (1943) wahrscheinlich gemacht, welche feststellten, daß Influenza-Virus bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45 - 55 % sechs Stunden überlebte.

Der Vergleich mit den Acceptormäusen, welche nicht durch ein Gitter von den Infektoren getrennt waren, zeigt, daß letztere zu einem höheren Prozentsatz infiziert wurden, als die durch Gitter abgetrennten. Bei Versuchen von Schulmann und Kilbourne (1963) konnten unter Verwendung einfacher Drahtgitter keine Differenzen zwischen abgetrennten und nicht abgetrennten Acceptoren verzeichnet werden. Dieses Ergebnis legt die Annahme nahe, daß der relativ große Zwischenraum der Doppelgitter (1 cm) in unseren Versuchen in erster Linie für diese Differenz verantwortlich zu machen ist. Grundsätzlich kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß in den Versuchen, in denen

Infektoren und Acceptoren nicht durch Gitter getrennt wurden, zumindestens ein Teil der Acceptormäuse durch direkten Kontakt (Berührung mit den Nasen) und durch indirekten Kontakt (gleiche Trinkflasche, gleiches Futter) infiziert wurde.

2. Vergleich der Kontagiosität von ei- bzw. mausadaptierten (P+)- und (P-)-Stämmen

Obwohl zwischen maus- und eiadaptierten Stämmen deutliche Unterschiede in der Virulenz vorhanden waren, ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Kontagiosität nachweisen. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß Mausadaptationen durch Verimpfung von Lungenmaterialien von Maus zu Maus keine selektiven Bedingungen für die Viruseigenschaften darstellen, welche für eine hohe Kontagiosität verantwortlich sind. Dieses Resultat stimmt mit den Arbeiten von Schulmann (1967) überein, welcher zwischen der Virulenz und der Kontagiosität eines Influenza-Stammes ebenfalls keine direkten Beziehungen feststellen konnte. Andererseits zeigte der Vergleich der in unserem Labor vorhandenen (P+)- und (P-)-Stämme, daß letztere eine statistisch signifikant höhere Kontagiosität aufwiesen (vergl. F) 5.).

3. Die Entwicklung der Kontagiosität im Verlauf der Übertragungen

Der Vergleich der Stämme, die aerogen übertragen worden waren, mit den entsprechenden Ausgangsstämmen, zeigte, daß die Kontagiosität bei den Übertragungen deutlich zunahm. Da die Stämme $M^{P\pm H\pm}$(A2/Tü/63)AER $lo^{P\pm H\pm}$ und M^{P-H-}(A2/Tü/63)AER $lo^{P-H\pm}$ auf gleiche Virulenz mit ihren Ausgangsstämmen eingestellt worden waren,

kann die Zunahme der Kontagiosität nicht auf eine Virulenzsteigerung als Folge der höheren Mausadaptation zurückgeführt werden. Man muß also annehmen, daß die hintereinandergeschalteten Übertragungen von Influenza-Virus von Infektor- auf Acceptormäuse selektive Bedingungen für die Viruseigenschaften, welche für eine hohe Kontagiosität verantwortlich sind, darstellen. Da der Vergleich von M^{P+H+}_{--}(A2/Tü/63)AER $2o^{P-H+}_{--}$ und M^{P+H+}_{--}(A2/Tü/63)AER $1o^{P+H+}_{--}$ keine weitere Kontagiositätssteigerung erbrachte, kann man annehmen, daß schon nach zehn Übertragungen ein Optimum an Kontagiosität erreicht wurde.

4. Die Entwicklung der Virulenz im Verlauf der Übertragungen

Der Vergleich der Stämme M^{P+H+}_{--}(A2/Tü/63)AER $1o^{P+H+}_{--}$ und M^{P-H-}(A2/Tü/63)AER $1o^{P-H+}_{--}$ mit den entsprechenden Ausgangsstämmen ergab eine Virulenzsteigerung um den Faktor 1o bzw. 5. Gemessen an der Zahl von 2o Maus- und 1o Bruteipassagen im Verlauf der Übertragungen, muß diese Zunahme als relativ gering bewertet werden. Dieses Ergebnis wird durch den Versuch E) 6. bestätigt, in welchem der Stamm E^{P-H-}(A2/Tü/6o)AER $2o^{P-H+}_{--}$ (4o Maus- und 2o Bruteipassagen) mit M^{P-H-}(A2/Tü/6o) (13 Mauspassagen durch direkte Verimpfung von Lungenmaterialien von Maus zu Maus) in bezug auf Virulenz und Kontagiosität verglichen wurde. Der Stamm M^{P-H-}(A2/Tü/6o) wies eine annähernd 1o mal so große Virulenz auf wie E^{P-H-}(A2/Tü/6o)AER $2o^{P-H+}_{--}$, wurde aber nicht auf Acceptormäuse übertragen. Dieses Resultat ermöglicht die Aussage, daß unter den durch die Übertragung verursachten Versuchsbedingungen eine Selektion unter Begünstigung anderer Viruseigenschaften stattfand als bei einer Mausadaptation durch Verimpfung von Lungenmaterialien von Maus zu Maus.

5. Die serologische Entwicklung der übertragenen Stämme und ihre Affinität zu Mukoproteinrezeptoren

Die aerogen übertragenen Stämme ließen in bezug auf ihre Affinität zu Mukoproteinrezeptoren eine deutliche Annäherung erkennen. Der Versuch E) 7. zeigt, daß im Verlauf der Übertragungen eine Entwicklung zu pferdeserumunempfindlichen Stämmen eintrat. Die Stämme M^{P+H+}(A2/Tü/63)AER $2o^{P-H\pm}$ und E^{P+H+}(A2/Tü/6o)AER $1o^{P-H\pm}$ verloren ihre Empfindlichkeit gegenüber Pferdeseruminhibitoren, während die Stämme M^{P-H-}(A2/Tü/63)AER $1o^{P-H\pm}$ und E^{P-H-}(A2/Tü/6o)AER $2o^{P-H\pm}$ wie ihre Ausgangsstämme pferdeserumunempfindlich blieben. Die Empfindlichkeit gegenüber Hühnerseruminhibitoren näherte sich bei den übertragenen Stämmen weitgehend an (Hämagglutinationshemmungstiter 4o - 8o); d.h. sie nahm bei M^{P+H+}(A2/Tü/63)AER $2o^{P-H\pm}$ und E^{P+H+}(A2/Tü/6o)AER $1o^{P-H\pm}$ ab und bei M^{P-H-}(A2/Tü/63)AER $1o^{P-H\pm}$ und E^{P-H-}(A2/Tü/6o)AER $2o^{P-H\pm}$ zu.

Cohen und Biddle berichteten 1964, daß als Folge einer Mausadaptation durch Verimpfung von Lungenmaterialien von Maus zu Maus eine Entwicklung zu pferdeserumempfindlichen Stämmen eintritt. Untersuchungen von Gerth (1968 b), welche mit genetisch reinen (P+)-, (H+)- bzw. (P-)-, (H-)-Stämmen durchgeführt wurden, zeigten hingegen, daß eiadaptierte (P+)-, (H+)-Stämme an Empfindlichkeit gegenüber Pferdeseruminhibitoren in Folge Mausadaptation abnahmen, die Hühnerserumempfindlichkeit jedoch erhalten blieb. Bei eiadaptierten (P-)-, (H-)-Stämmen trat im Verlauf der Mausadaptation hingegen eine Zunahme der Empfindlichkeit gegen Hühner- und Pferdeseruminhibitoren auf.

Unter Berücksichtigung der Versuche E) 1., in denen festgestellt wurde, daß (P-)-Stämme von vornherein besser übertragen wurden als (P+)-Stämme, und unter Hinweis auf den Verlust der Empfindlichkeit gegenüber Pferdeseruminhibitoren im Verlauf der Übertragungen, kann man vermuten, daß die Viruseigenschaften, die eine geringe Empfindlichkeit gegen Pferdeseruminhibitoren bedingen, bei den aerogenen Übertragungen einer gewissen Bevorzugung unterlagen.

Der Versuch E) 9. zeigt, daß sich die AER lo-Stämme bezüglich ihres Elutionsverhaltens annäherten. Die Elutionsgeschwindigkeit der übertragenen Stämme verhielt sich zu der der Ausgangsstämme uneinheitlich, so daß angenommen werden kann, daß die in der Elution erfaßten Faktoren nicht für die Kontagiositätszunahme verantwortlich gemacht werden können.

Im Versuch E) 10. konnten keine Differenzen zwischen der Neuraminidaseaktivität von AER lo- und Ausgangsstämmen festgestellt werden. Die Hypothese von Schulman (1967), welcher die Kontagiosität in Beziehung zu einer hohen Neuraminidaseaktivität setzte, konnte also nicht bestätigt werden.

G) Zusammenfassung

In den vorliegenden Untersuchungen gelang es mit Influenza A2-Virus aerogene Infektionen bei Mäusen hervorzurufen. Die Infektion erfolgte vorwiegend durch Tröpfchen- bzw. Staubinfektion. Vergleichende Untersuchungen der Kontagiosität von ei- bzw. mausadaptierten (P+)- und (P-)-Stämmen zeigten, daß pferdeserumunempfindliche Stämme signifikant besser übertragen wurden als pferdeserumempfindliche Stämme. Zwischen maus- und eiadaptierten Stämmen war kein Unterschied in der Übertragbarkeit nachweisbar. Durch hintereinander geschaltete Übertragungen gelang es, die Kontagiosität der Stämme zu verbessern. Der Vergleich der übertragenen Stämme mit den Ausgangsstämmen ergab, daß die Kontagiosität im Verlauf der Übertragungen deutlich zugenommen hatte, während die Virulenzsteigerung geringer war, als nach der Anzahl der Mauspassagen erwartet wurde. Ein durch direkte Verimpfung von Lungenmaterialien mausadaptierter Virusstamm (13 Mauspassagen) erwies sich als virulenter als der 2o mal aerogen übertragene entsprechende Stamm (4o Maus- und 2o Bruteipassagen). Dieses Ergebnis und die Tatsache, daß eiadaptierte Virusstämme ebenso gut übertragen wurden wie mausadaptierte, zeigt, daß zwischen Virulenz und Kontagiosität eines Stammes keine proportionalen Beziehungen bestehen.

Bei den Übertragungen trat eine Annäherung in bezug auf die Inhibitorenempfindlichkeit ein. Sämtliche übertragenen Stämme wurden bzw. blieben gegen Pferdeseruminhibitoren unempfindlich. Die Empfindlichkeit gegen Hühnerseruminhibitoren nahm teils zu teils ab und stellte sich auf einen Hämagglutinationstiter von

4o - 8o ein. Wenn man berücksichtigt, daß (P-)-Stämme von vornherein besser übertragen wurden als (P+)-Stämme, läßt sich vermuten, daß die Viruseigenschaften, welche eine geringe Pferdeseruminhibitorenempfindlichkeit verursachen, unter den durch die aerogenen Übertragungen geschaffenen Bedingungen einer gewissen Bevorzugung unterlagen.

H) Literaturverzeichnis

1. AMINOFF, D. : Methods for the quantitative estimation of N-acetyl-neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomuccoids.
Biochem. J. 81, 384 - 392 (1961)

2. ANDREWES, C.H., W. SMITH and C.H. STUART-HARRIS:
A study of epidemic influenza with special reference to the 1936 - 7 epidemic. Recovery of virus during the 1936 - 7 epidemic.
Med. Research Council (Brit.) Special Rept. Series 228, 1o5 - 1o7 (1938)

3. ARCHETTI, J. and F.L. HORSFALL jr.:
Persistant antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immunserum.
J. Expt. Med. 92, 441 - 462 (195o)

4. CLARKE, D.H. and J. CASALS:
Techniques for hemagglutination with arthropod borne viruses.
Am. J. Trop. Hyg. Vol. 7,5, 561 - 573 (1958)

5. COHEN, A. and F. BIDDLE:
The effect of passage in different hosts on the inhibitor sensitivity of an Asian influenza virus strain.
Virology 11, 458 - 473 (196o)

6. EATON, M.D. : Transmission of epidemic influenza virus in mice by contact.
J. Bact. 39, 229 - 241 (194o)

7. FISHER, R.A. : Statistical methods for research workers.
London: Oliver & Boyd 96 - 97 (1948)

8. GERTH, H.J. : (a) Über die Variabilität von Influenza A2-Viren.

Habilitationsschrift

Tübingen (1968)

9. GERTH, H.J. : (b) Änderung von in-vitro-Eigenschaften von Influenza A2-Stämmen nach Mausadaptation.

Vortrag auf der 2. Arbeitstagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie

Mainz (1968)

10. GRUNERT, R.R. W.L. DAVIES, J.W. MCGAHEN, C.E. HOFFMANN and R.A. YATES:

The antiviral activity of labile carbamyl compounds and cyanate against the pseudorabies virus in vivo.

J. infectious Diseases 116, 346 - 352 (1966)

11. KÄRBER, G. : Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Path. Pharmak. 162, 480 - 483 (1931)

12. LOOSLI, G.C., M.H. LEMON, O.H. ROBERTSON and E. APPEL:

Experimental airborne influenza infection
1. Influence of humity on survival of virus in air.

Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 53, 205 - 206 (1943)

13. SCHULMANN, J.L., E.D. KILBOURNE:

(a) Experimental transmission of influenza virus infection in mice
I. The period of transmissibility.

J.Expt. Med. 118, 257 - 266 (1963)

14. SCHULMANN, J.L., E.D. KILBOURNE:

(b) Experimental transmission of influenza virus infection in mice
II. Some factors affecting the incidence of transmitted infection.

J. Expt. Med. 118, 267 - 276 (1963)

15. SCHULMANN, J.L. : Experimental transmission of influenza virus infection in mice
IV. Relationship of transmissibility of different strains of virus and recovery of airborne virus in the environment of infector mice.

J.Expt. Med. 125, 479 - 488 (1967)

16. TAMM, J. and P.W. CHOPPIN:

Influenza viruses: A study in variation.

Immunochemical approaches to problems in microbiology

Herausgeber: Heidelberger, M. and O.J. Plescia and R.A. Day

Institute of Microbiology Rutgers, The State University 183 - 208 (1961)

Herrn Privat-Dozent Dr. Gerth bin ich für die Förderung vorliegender Untersuchungen und für die Unterstützung bei der Anfertigung der Niederschrift zu außerordentlichem Danke verpflichtet.

L e b e n s l a u f

Am 15.4.1945 wurde ich, Peter Warnecke, in Quedlingburg am Harz als Sohn des Amts- und Landgerichtsrates Heinrich Warnecke und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Weiße, geboren. Mein Vater fiel im September 1944 in Estland.

Von 1951 bis 1959 besuchte ich die Grundschule in Quedlinburg. Anschließend war ich Schüler der GutsMuths-Oberschule. Ab November 1960 besuchte ich das Kepler-Gymnasium in Tübingen. Am 25.2.1964 erwarb ich an dieser Schule das Reifezeugnis.

Vom Sommersemester 1964 bis zum Sommersemester 1969 studierte ich Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Am 1.4.1965 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 1.10.1966 die ärztliche Vorprüfung und am 5.2.1970 die ärztliche Prüfung.

Druckbüro Frau Elly HUTH, 74 Tübingen